

ACADÉMIE DE PARIS
UNIVERSITÉ RENÉ DESCARTES

FACULTÉ DE MÉDECINE NECKER-ENFANTS-MALADES

Année 1974

N°

75

THÈSE

pour le
DOCTORAT EN MÉDECINE
(Diplôme d'État)

par

PLOUSSARD Annette

Née le 13 Janvier 1946, à Châlons-sur-Marne (Marne)

Présentée et soutenue publiquement le

**ACTION DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA
(BACILLE PYOCYANIQUE)
SUR LES PROTÉINES PLASMATIQUES DE LA COAGULATION.**

**ACTIVATION DE LA PROTHROMBINE
ET LYSE DU FIBRINOGÈNE**

Président : Mr. J.-P. SOULIER, Professeur.

DUPUYTREN - COPY

9, Rue Dupuytren
PARIS (6°)

1974

ACADÉMIE DE PARIS
UNIVERSITÉ RENÉ DESCARTES

FACULTÉ DE MÉDECINE NECKER-ENFANTS-MALADES

Année 1974

N°

THÈSE

pour le
DOCTORAT EN MÉDECINE
(Diplôme d'État)

par
PLOUSSARD Annette

Née le 13 Janvier 1946, à Châlons-sur-Marne (Marne)

Présentée et soutenue publiquement le

**ACTION DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA
(BACILLE PYOCYANIQUE)
SUR LES PROTÉINES PLASMATIQUES DE LA COAGULATION.**

**ACTIVATION DE LA PROTHROMBINE
ET LYSE DU FIBRINOGENÈ**

Président : Mr. J.-P. SOULIER, Professeur.

DUPUYTREN - COPY
9, Rue Dupuytren
PARIS (6°)

1974

UNIVERSITÉ REINE DESCHARTES
ACADÉMIE DE PARIS

FACULTÉ DE MÉDECINE NECKER-ENFANTS-MALADES

N°

Année 1971

THÈSE

pour le

DOCTORAT EN MÉDECINE

(Diplôme d'État)

par

PIOUSARD Annette

(née le 17 janvier 1946 à Châteauneuf-Mont (Vosges))



ACTIVATION DE PSYCHOMORPHES ATRUCIOSA
(BACILLE PSYCHOMORPHES)
SUR LES PROTÉINES PLASMATIQUES DE LA COAGULATION
ACTIVATION DE LA PROTHROMBINE
ET LYSÉ DU FIBRINOGENE

Président : M. J. P. SOUBIER, Professeur.

DUPUYTREN COY

2 Rue Dupuytren

PARIS (20)

1971

A MON PÈRE

A MA MÈRE

A MES FRÈRES ET SŒUR

Je remercie

Monsieur le Professeur J.-P. SOULIER

Directeur du Centre National de Transfusion Sanguine

qui me fait l'honneur
d'accepter la présidence
de cette thèse.

A Monsieur le Professeur M. VÉRON ,

qui a permis la réalisation
de ce travail en m'accueil-
lant dans son service,

j'exprime mes remerciements.

A Monsieur le Professeur Agrégé F. JOSSO ,

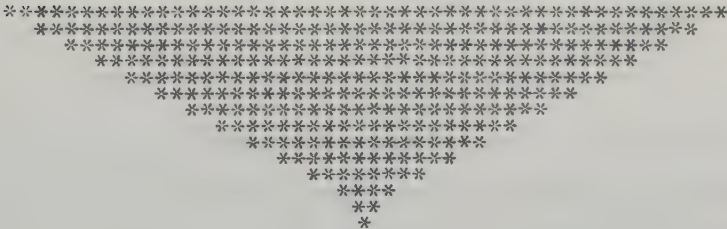
qui m'a guidée dans l'élaboration de cette thèse,

j'exprime ma reconnaissance
et mes remerciements.

ACTION DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA (BACILLE PYOCYANIQUE)

SUR LES PROTÉINES PLASMATIQUES DE LA COAGULATION.

ACTIVATION DE LA PROTHROMBINE ET LYSE DU FIBRINOGENE.



I N T R O D U C T I O N

Il est connu qu'au cours de certains états infectieux, des facteurs d'origine bactérienne sont capables de provoquer des troubles de l'hémostase, en particulier au cours des septicémies à Gram - (36) (coagulation intra-vasculaire disséminée ; syndrome fibrinolytique). Le mécanisme par lequel ces germes sont capables de déclencher la coagulation peut être indirect : action de l'endotoxine sur les plaquettes, les leucocytes ou les hématies (17). Il pourrait également être direct : activation du système des protéines plasmatiques de la coagulation.

C'est cette dernière action, de nature protéolytique vraisemblable, que nous avons cherché à mettre en évidence in vitro, en étudiant les activités coagulante et fibrinolytique de 18 souches de *Pseudomonas aeruginosa*.

M A T É R I E L

Les 18 souches étudiées appartiennent toutes à l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*. Elles ont été isolées, en 1972, chez des malades hospitalisés dans différents services, à partir des prélèvements suivants : aspiration trachéale (2) ; expectoration (2) ; fistule digestive (1) ; by-pass (1) ; drain pariétal (2) ; plaie (2) ; urines (3) ; selles (2) ; ponction ventriculaire (1) ; sang (2).

MILIEUX DE CULTURE STANDARD

1)- Milieu de conservation des souches.

Elles ont été entretenues par repiquage en gélose molle et conservées ainsi à la température du laboratoire.

2)- Milieu d'isolement : TSG (B-D Mérieux)

Un milieu empirique solide trypticase - soja - glucosé (TSG) a été utilisé pour l'isolement de chaque souche. Ce milieu, après inoculation, a été incubé à 30° C pendant 18 à 24 heures.

3)- Bouillon TSG.

Sa composition est la suivante, pour un litre d'eau distillée :

Trypticase	17 g
Phytone	3 g
Chlorure de sodium	5 g
Phosphate bipotassique .	2,5 g
Glucose	2,5 g

MILIEUX UTILISES POUR LA PRODUCTION DES "ENZYMES"

1)- Milieux liquides

- Bouillon "pour staphylocoagulase" (Institut Pasteur) :

Il s'agit d'un bouillon spécial pour la recherche de la staphylocoagulase, dont la composition est la suivante :

Digestion papaïnique de viande de veau	500 ml
Hydrolysate de gélatine .	20 ml
Citrate trisodique	3 g
Eau	480 ml

- Milieu synthétique : milieu M 70 de M. VERON (à paraître)

dont la composition est la suivante :

- a)- Milieu de base azoté :

Eau distillée	500 ml
NaCl	10 g
$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	1 g

Ajuster le pH à 7,0 - 7,2 avec NaOH 1 N.
Répartir par 500 ml en fioles de 1.000 ml.
Autoclaver à 120° C pendant 20 mn.

b)- Solution Pho - Ca - Mag :

Eau distillée	490 ml
CaCl ₂ , 2 H ₂ O	14,7 g
Mg SO ₄ , 7 H ₂ O	123 mg
KH ₂ PO ₄	680 mg
K ₂ H PO ₄	2.610 mg
Métaux 70	10 ml

Vérifier le pH distribué par 500 ml.

Autoclaver à 105° C pendant 20 mn. (La solution devient trouble à 110° C).

0,2 g/l de glucose est ajouté au milieu.

- Composition de la solution "Métaux 70" :

Dissoudre dans l'ordre :

Eau distillée	1.000 ml
PO ₄ H ₃	1.960 mg
Fe SO ₄ , 7 H ₂ O	55,6 mg
Zn SO ₄ , 7 H ₂ O	28,7 mg
Mn SO ₄ , 4 H ₂ O	22,3 mg
Cu SO ₄ , 5 H ₂ O	2,5 mg
Co (NO ₃) ₂ , 6 H ₂ O	3,0 mg
H ₃ BO ₃	6,2 mg

Conserver à + 4° C, sans autoclaver.

2)- Culture sur tambourin de cellophane.

- Préparation du tambourin.

Une feuille de cellophane de dimensions suffisantes est plongée dans l'eau bouillante, puis étendue et étirée sur un anneau de verre pyrex (diamètre: 9 cm), enfin fixée sur cet anneau au moyen de bracelets de caoutchouc. Le tambourin ainsi formé est posé

entre fond et couvercle d'une boîte de Pétri en verre, la cellophane reposant sur une feuille de papier filtre légèrement imbibée d'eau distillée.

L'ensemble est enveloppé dans du papier d'aluminium et stérilisé à l'autoclave à 115°C pendant 20 mn.

- Ensemencement.

Le tambourin est posé sur la gélose de façon à ce qu'aucune bulle n'apparaisse à l'interface.

L'ensemencement se fait par inondation de la boîte entière à partir d'une suspension en eau distillée (opacité légère), en ayant soin de réaspirer l'excès liquidien.

L'ensemble est placé à l'étuve à 30°C , après avoir recouvert le tambourin avec le couvercle de la boîte de Pétri.

- Récolte.

La culture obtenue sur la cellophane est récoltée, à l'aide d'un rateau, dans 0,5 ml d'eau distillée.

- Elimination des corps microbiens.

La suspension bactérienne est centrifugée à froid pendant 20 mn à 15.000 t/mn^{-1} .

Le surnageant est alors utilisé soit extemporanément, soit conservé à -20°C , après addition ou non de merthiolate à la concentration finale de 1 o/oo.

PLASMAS

- Plasma oxalaté de lapin lyophilisé (Institut Pasteur) :

Présenté en ampoules de 2 ml ou en flacons de 10 ml, il est reconstitué à la dilution optimale avec le volume convenable du dissolvant.

- Plasma oxalaté humain :

Il a été préparé à partir d'un pool de 4 à 5 donneurs, réparti en tubes de plastique et conservé à -20° C.

- Plasma "adsorbé" :

Le plasma oxalaté a été adsorbé par du phosphate tricalcique à raison de 10 mg/ml (1 %).

Après agitation pendant 15 mn environ et centrifugation pendant 10 mn à $3.000 \text{ tours/mn}^{-1}$, le surnageant, ainsi privé des facteurs II, VII, IX et X, est décanté. Ce plasma est utilisé extemporanément.

"ELUAT" DE LAPIN

Le précipité obtenu après décantation du plasma adsorbé, précipité riche en facteurs II, VII, IX et X, est élevé par le citrate 0,18 M (volume initial).

L'éluat est ensuite dialysé 12 h. contre le mélange suivant : Citrate 0,13 M (1 vol.) et "saline" (sérum physiologique à 9 o/oo : 5 vol.).

"ELUAT" HUMAIN

Fraction riche en facteurs II, VII, IX et X, obtenue par chromatographie sur DEAE-Sephadex d'un éluat préparé comme ci-dessus à partir du plasma humain.

EUGLOBULINES

Les euglobulines du plasma sont précipitées à faible force ionique à pH acide, à raison de 1 volume de plasma pour 19 volumes d'eau distillée acidifiée à pH 5,2 par l'acide acétique à 1 %. Après une heure de séjour à + 4° C, le mélange est centrifugé à 3.000 tours/mn⁻¹ pendant 10 mn. Le précipité est repris en tampon borate dans le volume initial du plasma.

HEPARINE (CHOAY)

Elle est utilisée à raison de 10 γ/ml de plasma.

DISQUES DE KOHN

(pour mise en évidence de la gélatinolyse)

Il s'agit de disques de gélatine au charbon dénaturée par le formol, préparés selon la technique de Kohn (22 bis).

FIBRINOGENE HUMAIN REACTIF (CNTS)

Il se présente sous forme d'une poudre sèche contenant 25 % de fibrinogène coagulable. Elle est dissoute extemporanément, soit en tampon phosphate pH 7,4, soit en milieu synthétique M 70, de façon à obtenir une concentration finale de 2 mg/ml.

FIBRINOGENE SANS PLASMINOGENE (CNTS)

Il se présente sous forme d'une poudre sèche contenant 60 % de fibrinogène coagulable. Après dissolution en tampon phosphate, il est utilisé à la même concentration que ci-dessus.

THROMBINE DE BOEUF (ROCHE)

Flacon de 5.000 unités N.I.H..

Une solution mère a été reconstituée avec 10 ml de tampon pH 7,0 et répartie en tubes à hémolyse en plastique par aliquotes de 0,1 ml, congelés à -20° C. Lors de son utilisation, la thrombine est diluée de manière à obtenir un réactif titrant 5 u./ml.

INHIBITEURS DES PROTEASES

- Sérum :

Constitué à partir d'un pool de donneurs, il est utilisé à raison de 1/10 du volume du solvant.

- Zymofren (SPÉCIA) :

Présenté sous forme d'ampoules de 5 ml contenant 5.000 u. K.I., il est utilisé à raison de 100 u./ml final.

- Iniprol (CHOAY) :

Flacon de 5 ml contenant 1 million d'unités, utilisé à raison de 10^3 et 10^4 u./ml final.

- Inhibiteur du soja : SBTI (SIGMA) :

Il se présente sous forme d'une poudre sèche, reconstituée en eau distillée et utilisée à raison de 0,1 et 1,0 mg/ml final.

M É T H O D E S

A)- COAGULATION.

1/- Coagulation du plasma oxalaté ou du plasma "adsorbé".

La méthode utilisée est la suivante : dans un tube à hémolyse stérile en verre, contenant 0,5 ml de plasma, est ajouté soit 0,5 ml de la culture en bouillon de la souche testée, soit 11 gouttes (0,1 ml) du surnageant de la culture sur cellophane. Après agitation, le mélange est porté à l'étuve à 37° C.

La lecture de la réaction est effectuée à intervalles de temps réguliers ($\frac{1}{2}$ h., 1 h., 2 h., 4 h., 8 h., 24 h.). La coagulation éventuelle du plasma est notée par $\pm$, + ou ++, selon la qualité du caillot. L'observation est poursuivie jusqu'à la lyse secondaire éventuelle de celui-ci et ce pendant 48 h.-

En l'absence de coagulation visible, on note si l'addition de thrombine (0,1 ml à 5 u./ml) est suivie ou non de la formation d'un caillot.

2/- Coagulation des euglobulines.

A 0,5 ml de la solution d'euglobulines est ajouté 0,1 ml du surnageant de la culture sur cellophane. Le mélange, après agitation, est placé à l'étuve à 37° C. La lecture de la réaction se fait dans les

mêmes conditions que précédemment.

3/- Coagulation en deux temps.

- Dans un premier temps, 0,3 ml du surnageant de la culture sur cellophane est ajouté à 0,3 ml de l'éluat et l'ensemble est mis à l'étuve à 37° C pendant 1 heure.

- Dans un deuxième temps, l'activité coagulante est testée en ajoutant, à 0,3 ml de l'incubat, 0,3 ml de fibrinogène à 2 mg/ml.

4/- Coagulation en présence d'héparine.

A 0,5 ml de plasma de lapin oxalaté est ajoutée de l'héparine (10 % /ml).

L'absence de coagulation en présence de thrombine est vérifiée sur un tube témoin.

Après addition de 0,1 ml du surnageant de la culture sur cellophane, la formation éventuelle d'un caillot est observée.

B)- P R O T E O L Y S E.

1/- Gélatinolyse : mise en évidence par la technique de Kohn (22 bis).

Les disques de gélatine sont introduits stérilement dans des tubes à hémolyse contenant, soit une suspension dense du germe à tester en eau distillée, soit 0,1 ml du surnageant de la culture sur cellophane. Après incubation à 37° C, la lecture de la réaction se fait à des intervalles de temps réguliers. Si le germe possède une gélatinase, sa présence se traduit par l'apparition de grains de charbon libres tombant dans le fond du tube, facilement

mis en évidence par agitation de celui-ci.

2/- Fibrinolyse : méthode des plaques de fibrine.

A 10 ml de la solution de fibrinogène à 2 mg/ml est ajouté 0,5 ml de thrombine à 5 u./ml. Après agitation, l'ensemble est coulé dans une boîte de Pétri de 10 cm de diamètre.

Dans certaines expériences, nous avons utilisé des boîtes de Pétri de 5 cm de diamètre en réduisant proportionnellement les volumes ci-dessus mentionnés.

Après solidification, la plaque estensemencée soit par inondation avec une dilution convenable du germe en eau distillée (culture en bouillon diluée de 10^{-8} à 10^{-10}), de façon à obtenir des colonies isolées, soit par dépôt en son centre de 0,1 ml du surnageant de la culture sur cellophane. Dans le premier cas, nous utilisons une solution de fibrinogène en milieu synthétique M 70. Après incubation à 37° C, la lecture de la réaction est effectuée au bout de 24 h., 36 h. et 48 h.- Une lyse de la fibrine se traduit par la présence d'un halo clair.

3/- Incorporation des inhibiteurs de protéases.

Ils sont additionnés à la solution de fibrinogène de manière à obtenir la concentration finale définie plus haut. La lyse, observée en 24 h. après dépôt de 0,1 ml du surnageant aseptique sur des plaques contenant les différents inhibiteurs, a été comparée à celle de plaques témoins.

4/- Plaques de fibrine sans plasminogène.

Elles sontensemencées par dépôt de 0,1 ml du surnageant aseptique. Après 24 heures d'incubation, une lyse éventuelle est notée.

R É S U L T A T S

A - RÉSULTATS GLOBAUX

Les résultats concernant la coagulation du plasma oxalaté de lapin et la gélatinolyse sont rassemblés dans les Tableaux I et II.

1) - Coagulase.

- 15 souches sur les 18 testées coagulent de façon totale ou partielle le plasma oxalaté de lapin généralement en 8 ou 24 heures et lysent secondairement la fibrine.

Si nous utilisons le surnageant de la culture sur cellophane, non additionné de merthiolate, toutes les souches coagulent le plasma. En général, la coagulation est totale et survient plus précocement après la mise en contact du plasma avec le surnageant : en 2 à 4 heures pour la majorité des souches, en 30 mn seulement pour l'une d'entre elles (souche B). Elle est également suivie d'une lyse de la fibrine.

- En présence de plasma d'origine humaine, les résultats sont négatifs avec toutes les souches. L'addition de thrombine au bout de 24 h. ne permet plus la formation d'un caillot.

- En présence de la solution d'euglobulines, les résultats sont identiques sur la souche B testée : positifs en 1 heure, s'il s'agit d'euglobuli-

nes de lapin ; négatifs en 24 heures, s'il s'agit d'euglobulines humaines, l'addition de thrombine n'étant plus suivie de la formation d'un caillot.

2)- Protéolyse.

- Toutes les souches lysent la gélatine, la majorité en moins de 48 h. Cette lyse débute le plus souvent entre la première et la quatrième heure après l'inoculation, et 13 fois sur 18 elle est manifeste lors de la 8ème heure. Seule la souche E n'est gélatinolytique qu'en 4 jours.

En présence du surnageant de la culture sur cellophane, la lyse est plus précoce ($\frac{1}{2}$ à 1 h.) et totale en 4 à 8 heures. Seule la souche N manifeste une activité lytique plus lente, puisque la lyse, débutante en 4 h., n'est totale qu'en 24 heures.

- Les 18 souches lysent la fibrine sur les plaques standards (dépôt du surnageant). En 24 heures, on note l'apparition de plages de lyse de 1 à 2 cm. de diamètre.

- Les souches A et B, ensemencées en milieu synthétique, permettent d'observer en 24 heures la formation de colonies entourées d'une zone plus claire. En 36 heures, on note la présence d'une cupule centrale et, en 48 heures, une plage de lyse d'environ 1 cm de diamètre, dont l'extension est rapide, aboutissant à la confluence des différentes plages.

Temps es ouches	$\frac{1}{2}$ h.	1 h.	2 h.	4 h.	8 h.	24 h.	48 h.	
Bouillon A					+	L		
urnageant			++	++	++	L		
B	++	++	+	L	++	L		
C			++	++	++	L		
D			++	++	+	L	L	
E			+	+	+	L	-	
F			++	++	++	L	-	
G			++	+	+	L	L	
H				++	++	+	++	L
I			+	+	+	L	L	
J			++	++	L		-	
K			++	++	++	L	L	
L						+	L	
M			+	+	+	L	+	L

N° des souches	Temps $\frac{1}{2}$ h.	1 h.	2 h.	4 h.	8 h.	24 h.	48 h.	
N					$\pm$	+	L	
					++	++	L	
O						++		
				$\pm$	+	L		
P					++	L		
			$\pm$	+	L			
Q						+	L	
			$\pm$					
R					++	L		
				+	+	L		

T A B L E A U I

COAGULATION DU PLASMA OXALATE DE LAPIN

$\pm$, +, ++ = Coagulation

L = Lyse

Temps Souches	$\frac{1}{2}$ h.	1 h.	2 h.	4 h.	8 h.	24 h.	48 h.	
Suspension A Surnageant				$\pm$	+	++	+++	
	+	++	++	+++				
B			$\pm$	+	++	+++		
	+	++	+++					
C		$\pm$	+	++	+++			
	+	++	+++					
D			$\pm$	+	++	+++		
	+	++	+++					
E							-	++(4 j.)
		+	++	++	+++			
F					$\pm$	+	++	
	+	++	+++					
G			$\pm$	+	++	++	+++	
	+	++	+++					
H					$\pm$	+	++	
			+	++	+++			
I			$\pm$	+	++	+++		
	+	++	++	+++				
J			$\pm$	+	++	+++		
	+	++	++	+++				
K			$\pm$	+	++	+++		
		+	++	+++				
L		$\pm$	+	++	++	+++		
	+	++	+++					
M				+	++	+++		
	+	++	+++					

Temps Souches	$\frac{1}{2}$ h.	1 h.	2 h.	4 h.	8 h.	24 h.	48 h.	
Suspension N						±	+	++
Surnageant				+	++	+++		
O				+	++	+++		
		±	+	++	+++			
P		±	+	++	+++			
	+	+	++	++	+++			
Q		±	+	++	++	+++		
	+	+	++	++	+++			
R		+	++	++	+++			
	+	+	++	+++				

TABLEAU II

,
GELATINOLYSE

B - ANALYSE DU MECANISME.

1)- Coagulation.

Aucune des 18 souches testées ne coagule le plasma adsorbé de lapin qui, après 24 h. d'incubation, n'est plus coagulable par la thrombine.

La souche B, qui coagule en 30 mn le plasma oxalaté de lapin, a été choisie pour étudier plus précisément le mécanisme d'action de cette réaction.

En présence du surnageant de la culture sur cellophane de cette souche, les éluats de lapin et d'homme coagulent après l'addition du fibrinogène, en moins d'une minute si le surnageant n'a pas été traité par le merthiolate, en 3 mn environ dans le cas contraire. La lyse secondaire est rapide ($\frac{1}{2}$ à 1 h.).

L'héparine inhibe la coagulation du plasma axalaté de lapin par le surnageant de la culture sur cellophane de cette même souche.

2)- Fibrinolyse.

= La lyse de la fibrine en présence d'inhibiteurs des protéases a été étudiée sur 10 souches (surnageant de la culture sur cellophane).

Le sérum inhibe totalement la lyse de la fibrine par la souche A; partiellement la lyse due aux autres souches : on ne note qu'un début de liquéfaction de la fibrine.

L'Iniprol et le Zymofren n'ont aucune action inhibitrice dans nos conditions expérimentales.

L'inhibiteur du soja, testé avec la seule souche B, inhibe légèrement la lyse de la fibrine par

celle-ci. Les diamètres des plages en fonction de la concentration du SBTI sont les suivants :

Témoin	:	2 cm
0,1 mg/ml	:	1,6 cm
1,0 mg/ml	:	1,2 cm

= Le surnageant aseptique de la culture sur cellophane des souches A et B lyse également la fibrine dépourvue de plasminogène (plages identiques à celles des témoins).

D I S C U S S I O N

I - RESULTATS GLOBAUX.

Les résultats qualitatifs concernant les 18 souches de *Pseudomonas aeruginosa* étudiées sont identiques. Celles-ci présentent trois activités définies par trois substrats : activité coagulante sur le plasma oxalaté de lapin, activité gélatinolytique, activités fibrino- et fibrinogénolytiques.

Ces activités peuvent être attribuées à un ou plusieurs produits de sécrétion du germe, de nature exocellulaire vraisemblable, puisque retrouvées dans le surnageant de la culture sur cellophane. Elles sont stables à la congélation, permettant donc une étude rétrospective, mais variables dans leur expression d'une souche à l'autre, dans les mêmes conditions de culture du germe.

Ces 18 souches semblent se comporter différemment vis-à-vis des plasmas de lapin et d'homme : elles coagulent le plasma de lapin et lysent secondairement la fibrine formée ; elles ne coagulent pas le plasma humain, mais cependant lysent le fibrinogène.

II - ETUDE ANALYTIQUE:

Elle nous a permis de préciser le mécanisme d'action de la coagulation et de la fibrinolyse et d'expliquer les différences apparentes de comportement des souches vis-à-vis des plasmas d'homme et de lapin.

A- Coagulation.

1)- Elle ne nécessite pas d'ions Ca^{2+} , puisque le plasma oxalaté en est dépourvu et coagule en présence des bactéries.

2)- La présence de prothrombine (ou facteur II) est nécessaire et/ou peut-être celle d'autres facteurs (X, VII, IX) absents dans le plasma adsorbé de lapin, qui ne coagule plus en présence des germes.

3)- La contre-épreuve vient confirmer ces données : le mélange éluat (donc fraction riche en facteurs II, VII, IX, X) et pyocyanique coagule le fibrinogène. Les résultats sont identiques avec les éluats de lapin et humain.

4)- L'action de la coagulase est inhibée par l'héparine.

Ces résultats permettent de tirer les conclusions suivantes :

a)- La coagulase n'agit pas directement sur le fibrinogène pour le transformer en fibrine.

b)- Elle agit par l'intermédiaire de la prothrombine qui est vraisemblablement transformée en thrombine, car son activité est sensible à l'héparine, donc aux antithrombines physiologiques.

c)- Cette action sur la prothrombine peut être directe ou indirecte par activation du facteur X présent dans le système éluat - surnageant. Les résultats expérimentaux ne permettent pas de conclure, mais une action de type indirect semble peu probable, car le facteur V, qui serait nécessaire à l'action du Xa, n'est pas présent dans le mélange éluat - surnageant.

d)- Les différences apparentes observées dans l'activité des souches vis-à-vis des plasmas oxalatés d'homme et de lapin ne sont que des artéfacts dus aux

conditions expérimentales, puisque l'activité coagulante est semblable dans les deux systèmes éluats-surnageants. Des inhibiteurs présents dans le plasma humain, antithrombines physiologiques et peut-être inhibiteurs sériques de la coagulase, marquent la réaction au profit de la fibrinogénolyse.

B - Fibrinolyse.

1)- Toutes les souches étudiées possèdent une activité fibrinogénolytique sur le plasma oxalaté humain et sur le plasma "adsorbé" de lapin : l'addition secondaire de thrombine n'est plus suivie de coagulation.

2)- Leur activité fibrinolytique est constante sur les plaques de fibrine riches en plasminogène. Cette action sur la fibrine peut être directe ou indirecte, par l'intermédiaire du plasminogène présent.

3)- La lyse identique obtenue sur les plaques dépourvues de plasminogène indique un mécanisme d'action direct de la pyolysine sur la fibrine.

4)- L'action des inhibiteurs est variable : nulle pour l'inhibiteur de Kunitz, partielle pour l'inhibiteur du soja, totale ou presque pour les antiprotéases sériques.

III - INFLUENCE DES CONDITIONS EXPERIMENTALES.

1)- Les activités coagulante et lytique varient d'une souche à l'autre. Cette variabilité, surtout observée dans l'activité coagulante, apparaît tant dans les temps de coagulation que dans la qualité du caillot obtenu. C'est dire l'importance de la sélection de souches capables de produire des quantités importantes de coagulase pour une étude quantitative plus précise.

2)- L'influence des conditions de culture des germes sur la production des "enzymes" n'a pas été étudiée ici.

3)- Le choix de l'oxalate comme anticoagulant est rendu nécessaire par la possibilité de fausses réactions positives en milieu citraté, dues à l'utilisation du citrate par le bacille pyocyanique, permettant la libération des ions Ca^{2+} .

IV - ENZYMES ET ACTIVITE ENZYMATIQUE.

A - Nature et propriétés des "enzymes".

1)- Leur origine vraisemblablement exocellulaire est à noter, rendant possible leur préparation indépendamment de la présence des germes.

2)- Leur stabilité à la congélation permet un stockage éventuel, et par conséquent une étude rétrospective.

3)- Leur nature chimique n'a pas été étudiée ici, mais l'on peut postuler, en se référant au type d'activité probablement enzymatique, qu'elle est vraisemblablement protéique.

B - Nature de l'action enzymatique.

1)- On peut supposer une action sur le fibrinogène de type protéolytique. Il faudrait, pour l'affirmer, démontrer l'existence de produits de dégradation solubles.

2)- Il paraît plus difficile d'affirmer une action semblable de la coagulase, si du moins l'on se réfère à l'action de la staphylocoagulase, qui

n'agit pas par protéolyse de la molécule de prothrombine, mais en formant avec cette dernière un complexe. Une telle action de protéolyse semble cependant possible en raison des arguments témoignant de la formation de thrombine apparemment physiologique (sensibilité aux antithrombines).

C - Les mêmes enzymes ou des enzymes différentes sont-elles responsables de ces diverses activités ?

1)- La gélatinolyse et la fibrinogénolyse ont des chances d'être deux expressions de la même enzyme protéolytique.

2)- Les activités coagulante et lytique pourraient être également l'expression d'une même enzyme, à l'exemple de la trypsine. La comparaison de ces deux activités ne permet pas de tirer des conclusions en faveur de l'une ou l'autre hypothèse.

V - COMPARAISON AVEC LES DONNEES DE LA LITTERATURE.

A - Coagulation.

1)- La coagulation par quelques souches de bacille pyocyanique du plasma d'oise ou de lapin est connue depuis longtemps déjà, puisque LOEB, en 1903 (24), et FISHER, en 1936 (11), mentionnent cette activité des germes, sans toutefois préciser la nature de l'anticoagulant utilisé. HOFF et DRAKE, en 1960, notent également la coagulation du plasma citraté ou recueilli sur EDTA par quelques souches de *Pseudomonas aeruginosa* (cité dans 1).

2)- Des études plus précises sur l'activité coagulante de ces bactéries sont dues à FREDERICQ et GRATIA (1941-42). Constatant que plusieurs souches sont capables de coaguler le plasma oxalaté de lapin

en 2 h.30, les auteurs cherchent à préciser le mécanisme d'action de cette coagulation((13, 14).

a)- Comportement global des souches :

Toutes les souches n'ont pas d'activité coagulante.

Les souches qui coagulent le plasma oxalaté de lapin sont toujours fibrinolytiques.

Celles qui ne coagulent pas le plasma oxalaté ont cependant une activité fibrinogénolytique.

Le filtrat stérile des cultures en bouillon est également actif.

Les auteurs concluent à l'élaboration par les bactéries dans le milieu de culture d'un produit de sécrétion, capable de coaguler le plasma de lapin oxalaté.

b)- Mécanisme d'action :

Après centrifugation, filtration et précipitation par l'alcool d'une culture du germe sur membrane de cellophane, les auteurs tentent de préciser le mécanisme d'action de la coagulation. Dans ces conditions, le produit obtenu ne coagule pas la solution de FG purifiée, ni le plasma de lapin adsorbé par le phosphate tricalcique. La coagulation est inhibée ou ralentie par l'hirudine, l'héparine ou l'antithrombine.

Les auteurs concluent à l'existence d'une enzyme protéolytique coagulant le plasma oxalaté de lapin par activation de la prothrombine en thrombine.

B - Fibrinolyse.

1)- La lyse secondaire à la formation du caillot est constamment observée par ces mêmes auteurs.

Celle-ci est rapide et il semble exister un parallélisme étroit entre les activités coagulante et fibrinolytique des souches.

Le filtrat concentré manifeste également une activité lytique parallèle à son activité coagulante. Les souches qui ne coagulent pas le plasma oxalaté ont une activité fibrinogénolytique, car le plasma n'est plus coagulable par recalcification.

: 2)- Des travaux de RANGAM, en 1961, précisent l'activité fibrinolytique de ces bactéries sur des plasmas coagulés de différentes espèces (Homme - Lapin - Mouton) (26). En 24 heures, la moitié des souches testées entraînent une liquéfaction partielle ou complète du plasma coagulé de lapin. Parmi ces souches, toutes ne sont pas actives sur les plasmas d'homme et de mouton.

Les filtrats stériles des bouillons de culture sont également fibrinolytiques.

VI - DONNÉES CONCERNANT LES AUTRES COAGULASES ET FIBRINOLYSINES BACTÉRIENNES.

A - Coagulases.

1)- Staphylocoagulase.

Elle a été étudiée par de nombreux auteurs et considérée comme un critère de pathogénicité potentielle. Les étapes suivantes ont permis de préciser son mécanisme d'action, grâce principalement aux recherches de TAGER aux Etats-Unis (31, 32, 33) et SOULIER en France (28, 29, 30).

a)- La coagulation du FG par la staphylocoagulase nécessite la présence d'un cofacteur plasmatique:

C'est à la suite des travaux de HALE et SMITH

que fut soulignée la nécessité de l'intervention d'un facteur plasmatique dans cette réaction (27 a), qui fut dénommée coagulase-reacting-factor (CRF).

L'action de ce cofacteur était ainsi schématisée par TAGER :

Staphylocoagulase + CRF $\longrightarrow$ Complexe "SC - CRF"

Complexe "SC - CRF" + FG $\longrightarrow$ Fe

Deux points importants sont à souligner :

. Cette coagulation s'effectue en l'absence d'ions Ca^{2+} , en présence d'EDTA, de citrate, d'oxalate et même d'héparine.

. Une spécificité d'espèce est mise en évidence; les plasmas d'Homme et de Lapin constituant de bonnes sources de CRF, les plasmas bovins étant insensibles à la staphylocoagulase.

b)- Il y a identité d'activité entre la thrombine et le complexe "staphylocoagulase - CFR" (thrombine - coagulase).

. Les deux substances hydrolysent le TAME.

. In vitro, aucune différence n'est trouvée entre les fibrinopeptides libérés par le complexe ou par la thrombine (6).

. Les deux réactions sont inhibées par le DFP (5).

. Elles ne le sont pas par l'inhibiteur du soja.

c)- On note cependant quelques différences entre les propriétés de la thrombine et de la thrombine-coagulase :

. Cette dernière n'active pas le facteur XIII et n'est pas inhibée par l'antithrombine III, l'héparine, l'hirudine. Ces résultats peuvent être expliqués par

des différences de structure entre les deux molécules, comme nous le verrons plus loin.

Des différences existent également dans les caractéristiques d'adsorption.

Ces données permettent d'aboutir à la conclusion que la transformation du FG en Fe ne diffère pas selon qu'elle est due à l'action du complexe "coagulase - CRF" ou à celle de la thrombine physiologique, mais qu'il n'y a toutefois pas identité structurale entre les deux molécules.

d)- Il y a identité entre la prothrombine (ou facteur II) et le CRF.

. De nombreux arguments témoignent en faveur d'une telle identité : SOULIER et coll., étudiant les taux du facteur II et du CRF dans diverses conditions, montrent qu'ils évoluent parallèlement au cours de la coagulation in vitro, dans les déficits congénitaux en prothrombine chez l'Homme. Ils sont modifiés par les mêmes adsorbants et après chromatographie sur DEAE, Sephadex. L'activité CRF est précipitée par les anticorps antiprothrombine spécifiques.

. Quelques contradictions apparentes ont été éclaircies par l'usage d'anticorps antiprothrombine, permettant le dosage immuno-chimique de celle-ci : en effet, au cours des traitements par les antivitamines K, le taux de CRF est moins déprimé que le taux de facteur II ; CRF et II ont également un comportement différent au cours de la filtration du plasma sur filtres Seitz (amiante) ; il a été enfin observé un déficit congénital en prothrombine sans déficit en activité CRF (22). Dans toutes ces situations, il s'agit d'anomalies qualitatives de la molécule de prothrombine, qui perd sa propriété d'être activée en thrombine, par la prothrombinase physiologique, mais conserve celle de former avec la staphylocoagulase un complexe actif.

e)- La formation in vitro de la thrombine-coagulase.

Le complexe formé par l'interaction prothrombine - staphylocoagulase est capable de coaguler en quelques secondes le fibrinogène purifié en détachant les fibrinopeptides.

SOULIER et coll. ont montré que la formation de ce complexe est indépendante de la température et proportionnelle aux concentrations de chacun des facteurs en présence. La cinétique de la réaction est totalement différente de celle de la thrombino-formation physiologique, et l'action de la coagulase n'est pas de nature enzymatique. Le fait que des anticorps spécifiques anti-facteur II ou anti-staphylocoagulase inhibent l'activité de la thrombine-coagulase témoigne de la formation d'un complexe, où les deux molécules sont également indispensables au développement de l'activité thrombique.

La formation de ce complexe serait responsable de la modification de la structure tertiaire de la prothrombine, dévoilant le site actif de celle-ci, lequel possède les propriétés coagulantes et estérasiques. En même temps, se trouveraient modifiés les sites de certains inhibiteurs, devenant insensibles à l'action de l'antithrombine III, de l'héparine, de l'hirudine.

2)- Autres coagulases bactériennes.

Diverses bactéries sont mentionnées dans la littérature comme étant capables de coaguler le plasma.

Il faut mettre à part les streptocoques du groupe D, responsables de fausses réactions positives. En effet, ces germes sont capables d'utiliser le citrate, par conséquent de libérer les ions Ca^{2+} , qui permettent la coagulation du plasma citraté (10, 34, 37).

a)- Bactéries Gram + :

- Bacillus subtilis : son activité coagulante est mentionnée par FISHER (1936) (11) vis-à-vis du plasma de Lapin, par FREDERICQ (1941) également vis-à-vis du plasma de Lapin oxalaté (12), par BURROWS enfin en 1957 (cité dans 1).

- Actinomyces : une étude de FREDERICQ, en 1946, précise le mécanisme d'action de la coagulase élaboré par ces germes et l'action sur le plasma oxalaté de Lapin (16). Elle ne coagulerait pas le plasma adsorbé par le phosphate tricalcique, ni la solution du fibrinogène.

L'auteur conclut qu'il s'agit d'une enzyme protéolytique qui permettrait l'activation de la prothrombine en thrombine en l'absence d'ions Ca^{2+} .

b)- Entérobactéries :

Quelques auteurs attribuent l'activité coagulante de certaines entéro-bactéries à l'utilisation du citrate par celles-ci (HARPER et CONWAY, 1948 ; BAYLESS, 1965) (1, 18).

La majorité des études consacrées à la mise en évidence de cette activité tendent à infirmer les précédentes.

- Salmonelles, Shigelles.

La coagulation du plasma citraté par un certain nombre de Salmonelles est signalée en 1954 par MUSHIN et KERR (25).

Une étude de JEDLICKOVA, en 1960, sur les anti-coagulants utilisés dans le test de la coagulase (21) montre que toutes les souches de Salmonelles testées coagulent en 24 heures le plasma hépariné, ne coagulent pas les plasmas citraté et oxalaté de Lapin.

Quelques souches de Shigelles manifestent également une activité coagulante en présence du plasma

hépariné.

L'auteur n'explique pas ces résultats - coagulation du seul plasma hépariné -, mais pense qu'ils doivent être attribués aux différences dans le mécanisme d'action des substances anticoagulantes utilisées.

- Proteus :

Les mêmes résultats sont rapportés par cet auteur, c'est-à-dire l'existence d'une activité coagulante pour toutes les souches testées en présence du seul plasma hépariné (21).

-- Escherichia coli :

KRECH, en 1952 (23) et BAYLISS, en 1965 (1), notent la coagulation par quelques souches du plasma citraté de différentes espèces dont l'Homme et le Lapin, mais cette réaction est attribuée à une utilisation du citrate (1, 23).

Par contre, JEDLICKOVA observe qu'une majorité des souches, qui ne coagulent pas le plasma oxalaté, et de façon variable le plasma citraté, coagulent le plasma hépariné (21).

- Serratia marcescens :

Ces bactéries seraient capables, selon FREDERICQ, de coaguler le plasma oxalaté de Lapin (15). Après concentration et purification, l'auteur précise le mécanisme d'action de cette coagulase. Elle ne coagule ni le plasma adsorbé par le phosphate tricalcique ni la solution purifiée de fibrinogène. Il lui reconnaît des caractères et un mode d'action identiques à ceux de la coagulase du pyocyanique.

Nous-mêmes avons étudié 18 souches de *Serratia* sans jamais observer de coagulation du plasma oxalaté de Lapin.

- Yersinia pestis :

La coagulation du plasma oxalaté de Lapin par le bacille de la peste est observée par FREDERICQ en 1941 (12) ; celle du plasma citraté de Lapin, par JAWETZ et MEYER, en 1944 (20).

- Des études plus précises de EISLER, en 1960 (9), montrent que les deux-tiers des souches testées coagulent le plasma humain, et que cette réaction dépend de différents facteurs : elle n'est positive que si l'inoculum est massif (10⁸ cellules) ; la nature et la concentration de l'anticoagulant jouent un rôle important : la réaction, positive en présence d'oxalate ou de citrate, est inhibée par l'héparine ; une concentration trop élevée de citrate ralentit, voire empêche toute coagulation.

Le filtrat des cultures ne possède plus l'activité coagulante.

Aucune corrélation ne peut être établie entre cette activité et la virulence des souches.

- DOMARSKI, en 1962, obtient des résultats identiques ; mais en présence du plasma de Lapin, citraté ou oxalaté, environ deux-tiers des souches coagulent (4). Il note une corrélation entre cette activité et l'activité fibrinolytique. Les souches non coagulantes ne sont pas fibrinolytiques.

Mais il n'obtient que quelques résultats positifs sur le plasma humain. Cette différence apparente pourrait être attribuée, selon l'auteur, à une concentration plus élevée en citrate de sodium.

- Les dernières recherches sur l'activité coagulante de ces germes sont dues à BEESLEY, en 1967, qui tente de préciser les relations entre la production de pepticine I, de coagulase et de fibrinolysine (2). Les activités fibrinolytique et coagulante ne peuvent être distinguées l'une de l'autre.

L'auteur conclut que rien cependant ne permet d'affirmer que les activités coagulante et fibrinolytique sont l'expression d'une même enzyme, quoiqu'elles

ne soient pas différenciées par les méthodes biologiques utilisées.

3)- Candida albicans.

Il s'agit d'une levure, dont l'activité coagulante mérite d'être mentionnée : elle coagule le plasma, mais ne coagule ni le fibrinogène ni le plasma adsorbé. Cette activité n'est pas inhibée par l'héparine (38).

B - Fibrinolysines bactériennes.

1)- Staphylokinase.

Elaborée par la plupart des staphylocoques pathogènes d'origine humaine, elle est extraite des filtrats de culture. Elle n'agit pas directement sur la fibrine, mais active le plasminogène.

2)- Streptokinase.

Elle est élaborée par les streptocoques β -hémolytiques des groupes A, C et G de LANCEFIELD. Elle agit par activation du système fibrinolytique, en se combinant avec le PG humain, pour former un complexe capable de transformer le PG en Pe. Elle peut également se combiner avec la Pe, pour former un complexe identique dans son action sur le PG.

La streptokinase est spécifique d'espèce. En particulier, elle n'est pas active sur le PG bovin. L'addition de sérum humain permet cependant l'activation du système fibrinolytique : le sérum humain apporte donc un cofacteur nécessaire, qui n'est autre que le PG humain.

3)- Peu d'autres bactéries ont été étudiées du point de vue de leur activité fibrinolytique.

Une telle activité a été recherchée par EGOROV sur plaques de fibrine. Quelques Mycobactéries et toutes les souches d'Actinomycètes testées possèdent cette activité (7, 8).

Elle est également notée chez des bactéries telles que les *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. mesentericus*) par IMSHENETSKII (19), mentionnée dès 1936 par FISHER (11).

Seule l'activité fibrinolytique de *Y. pestis* est étudiée par plusieurs auteurs, dans le but d'établir une corrélation avec la virulence des souches (3, 2, 35). Ce caractère n'est pas constamment retrouvé, mais une majorité des souches lysent la fibrine sur plaques. Il existe une relation directe entre l'aptitude des germes à coaguler le plasma et leur activité lytique. Il n'existe pas, par contre, de corrélation entre cette dernière et la virulence.

La fibrinolysine de *Y. pestis* n'agirait pas directement sur la fibrine. Par ailleurs, il semble qu'elle soit liée à la paroi bactérienne.

C O N C L U S I O N S

Les activités coagulante et fibrinolytique de 18 souches de *Pseudomonas aeruginosa* ont été étudiées.

Toutes les souches coagulent le plasma de lapin et lysent le fibrinogène dans les conditions expérimentales observées.

Cette coagulation a lieu en l'absence d'ions calcium.

L'analyse de ces phénomènes a été entreprise sur l'une de ces souches, choisie en raison de sa forte activité. Les résultats obtenus permettent de penser que :

1)- Les activités sont supportées par un ou plusieurs facteurs sécrétés dans le milieu de culture.

2)- L'activité coagulante ne s'exerce pas directement sur le fibrinogène, mais exprime la transformation de la prothrombine en thrombine. Le mécanisme de cette transformation reste à élucider. Pour l'instant, on peut considérer qu'elle se rapproche de l'action de la staphylocoagulase du fait que le calcium n'est pas nécessaire à son action. Par contre, les inhibiteurs physiologiques, et en particulier l'héparine, en présence d'antithrombine II, inhibent l'activité coagulante formée, ce qui rapproche celle-ci de la thrombine physiologique. Il reste cependant à établir si les activateurs de la thromboplastinoformation endogène (les facteurs X et V en particulier) jouent ou non un rôle en étudiant l'action de ce facteur coagulant sur une thrombine purifiée.

3)- L'activité fibrinolytique s'exerce également sur le fibrinogène et la fibrine, par un mécanisme direct, indépendant du plasminogène. Elle est au moins partiellement inhibée par les antiprotéases du plasma.

Ces faits constituent des bases objectives pour la discussion du mécanisme et du traitement des troubles de l'hémostase observés au cours des septicémies à *Pseudomonas aeruginosa*, où peuvent se trouver diversement associées coagulation intravasculaire diffuse et fibrinolyse.

VU & PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur
de l'Académie de Paris,

R. MALLET

Le Doyen de la Faculté de Médecine
Necker - Enfants-Malades,

Pr. JÉRÔME

Le Président de la thèse,

J.-P. SOULIER

B I B L I O G R A P H I E

=====

- 1- BAYLISS B.G. and HALL E.R.- Plasma coagulation by organisms other than *Staphylococcus aureus*.- J. Bact. 1965, 89, 101.
- 2- BEESLEY E.D., BRUBAKER R.R., JANSSEN W.A. and SURGALLA M.J.- Pesticins. III- Expression of coagulase and mechanism of fibrinolysis.- J. Bact. 1967, 94, 19.
- 3- DOMARDESKII I.V. and YARMYUK G.A.- Lysis of human and animal fibrins by the plague microbe.- Bull. Exptl. Biol. Med. 1961, 50, 694.
- 4- DOMARDESKII I.V., YARMYUK G.A., VASYUKHINA L.V., KOROTAEVA A.F.- On blood plasma coagulation by plague and pseudotuberculosis microbes.- Bull. Exptl. Biol. Med. 1963, 56, 779.
- 5- DRUMMOND M.C. and TAGER M.- Enzymatic activities associated with clotting of fibrinogen by staphylocoagulase and coagulase reacting factor and their inhibition by diisopropylfluorophosphate.- J. Bact. 1962b, 83, 975.
- 6- DRUMMOND M.C. and TAGER M.- Fibrinogen clotting and fibrinopeptides formation by staphylocoagulase and the coagulase reacting factor.- J. Bact., 1963, 85, 628.
- 7- EGOROV N.S., USHAKOVA V.I. and NIKOLSKII L.M.- On

the ability of certain microorganism to form fibrinolytic substances.- Dokl. Biol. Sci. 1965, 165, 762.

- 8- EGOROV N.S. and USHAKOVA V.I.- Fibrinolytic and proteolytic activities of some mycobacteria.- Appl. Biochem. Microb. 1966, 2, 466.
- 9- EISLER D.- Coagulation of human plasma by Pasteurella pestis.- J. Bact. 1961, 81, 241.
- 10- EVANS J., BUETTNER L., NIVEN C.- Occurrence of streptococci that give a false-positive coagulase-test.- J. Bact. 1952, 64, 433.
- 11- FISHER A.M.- The plasma coagulating properties of staphylococci.- Bull. Johns Hopk. Hosp. 1936, 59, 393.
- 12- FREDERICQ P., GRATIA A.- Staphylocoagulase et pyocyanicoagulase.- Acta Biol. Belg. 1941, I, 110.
- 13- FREDERICQ P., GRATIA A.- Mode d'action différent de la staphylocoagulase et de la pyocyanicoagulase.- Acta Biol. Belg. 1941, I, 114.
- 14- FREDERICQ P., GRATIA A.- Des actions coagulantes et fibrinolytiques du staphylocoque, du bacille pyocyanique.- Acta Biol. Belg. 1941, I, 462.
- 15- FREDERICQ P., GRATIA A.- Sur la coagulation du plasma oxalaté par les cultures de Bacillus prodigiosus.- C.R. Séance Soc. Biol. 1946, 140, 1132.
- 16- FREDERICQ P., GRATIA A.- Sur la coagulation du plasma oxalaté par les cultures d'Actinomyces.- C.R. Séance Soc. Biol. 1946, 140, 1166.

- 17- GARG S.K. and NIEMETZ J.- Tissue factor activity of normal and leukemic cells.- Blood, 1973, 42, 729.
- 18- HARPER E. and CONWAY N.- Clotting of human citrated plasma by Gram-negative organisms.- J. Path. Bacter. 1948, 60, 247.
- 19- IMSHENETSKII A.A. and BROTSKAYA S.Z.- Selection of microorganisms having thrombolytic activity.- Microbiology, 1969, 38, 897.
- 20- JAWETZ E. and MEYER K.F.- Studies on plague immunity in experimental animals. II- Some factors on the immunity mechanism in bubonic plague.- Immun. 1944, 49, 15.
- 21- JEDLICKOVA - BESTAKOVA Z.- Beitrag zur Wirkung verschiedener gerinnungshemmender Stoffe beim Koagulasetest.- Zbl. f. Bakt. Abt. I. Origin. 1960, 178, 304.
- 22- JOSSO F., LAVERGNE J.M. et SOULIER J.-P.- Les dysprothrombinémies constitutionnelles et acquises. - Nouv. Rev. Franç. Hémat. 1970, 10, 633.
- 22 bis - KOHN J.- Preliminary report of a new gelatin liquefaction method.- J. Clin. Path. 1953, 6, 249.
- 23- KRECH U.- Untersuchungen über die Koagulation von menschlichem und tierischem Plasma durch Bacterium coli.- Zeitsch. f. Immunitätsforsch. 1952, 109, 206.
- 24- LOEB L.- The influence of certain bacteria on the coagulation of the blood.- J. Med. Res. 1904, 10, 407.

- 25- MUSHIN R. and KERR V.J.- Clotting of citrated plasma and citrate utilisation by intestinal Gram-negative bacilli.- J. Gen. Microb. 1954, 10, 445.
- 26- RANGAM M., GUPTA J.C., BHAGWAT R. and BHAGWAT A.G.- Fibrinolytic activity of *Pseudomonas aeruginosa*. - Int. J. Med. Res., 1961, 49, 232.
- 27- SMITH W. and HALE J.H.- Nature and mode of action of staphylococcus coagulase.- Brit. J. Exptl. Pathol. 1944, 25, 101.
- 28- SOULIER J.-P., PROU-WARTELLE O.- Cofacteur de la staphylocoagulase et facteur II (Prothrombine).- Nouv. Rev. Franç. Hémat. 1966, 6, 623.
- 29- SOULIER J.-P., LEWI S., PAUTY A.M., PROU-WARTELLE O.- Préparation, concentration et étalonnage de la staphylocoagulase.- Rev. Franç. Etudes Clin. et Biol. 1967, 12, 544.
- 30- SOULIER J.-P.- La thrombine-coagulase.- Ann. Biol. Clin. 1969, 27, 285.
- 31- TAGER M.- Staphylocoagulase.- Bull. N.-Y. Acad. Med. 1954, 30, 475.
- 32- TAGER M.- Staphylocoagulase.- Bull. N.-Y. Acad. Med. 1956, 65, 109.
- 33- TAGER M. and DRUMMOND M.C.- Staphylocoagulase.- Ann. Y.-Y. Acad. Sci. 1965, 128, 92.
- 34- WOOD H.- The clotting of rabbit plasma by group D Streptococci.- J. Gen. Microb. 1959, 21, 385.
- 35- YARMYUK G.A.- The fibrinolytic properties of *Pasteurella pestis* and pseudotuberculosis.- J. Microb.

Epidem. Immunobiol. 1961, 32, 1736.

- 36- YOSHIKAWA T., TANAKA K.R. and GUZE L.B.- Infection and disseminated intravascular coagulation.- Medicine 1971, 50, 237.
- 37- YOUNG C.S. and LEITNER J.E. - The isolation of coagulase positive enterococci from clinical material.- Amer. J. Med. Techn. 1964, 30, 199.
- 38- ZAIKINA N.A. and ELINOV N.P.- Endofactor from *Candida albicans* and its action on plasma clotting mechanism. (In Russian).- Probl. Gemat. Moskow. 1968, 13, 37.
-

